

УДК 574-24

Comparative Study of the Toxic Effect of Cadmium and Nickel on the Active and Resting Stages of Cladoceran *Moina macrocopa*

Tatiana S. Lopatina^a, Nadezhda P. Bobrovskaya^b,
Natalia A. Oskina^{a,b} and Egor S. Zadereev^{*a,b}

^a*Institute of Biophysics SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

^b*Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 18.01.2016, received in revised form 26.01.2016, accepted 14.10.2016

*The aim of the study is to compare concentrations of cadmium and nickel that induce negative effects on survival and life cycle parameters of active and resting stages of cladoceran *Moina macrocopa*. In acute and chronic tests with active animals we determined standard toxicological parameters: half lethal concentration (LC50) when 50 % mortality of tested animals is observed and effective concentration (EC50) when 50 % reduction of the net reproductive rate of females of *Moina macrocopa* is detected. LC50 for cadmium in 48-hours test was equal to 0.18 mg/l; for nickel – 5.59 mg/l. EC50 for cadmium was equal to 0.005 mg/l, for nickel – 0.323 mg/l. It was demonstrated that long-term (30-40 days) exposure of resting eggs of *M. macrocopa* to the effect of solutes of cadmium and nickel in the wide range of concentrations (from background to the 60-70 g/l) did not affect the survival of resting eggs and life cycle parameters (specific rate of juvenile growth, number of hatched clutches, net reproductive rate) of hatchlings from exposed eggs. Thus, resting eggs of *M. macrocopa* can tolerate without negative survival effects concentrations of toxicants that far exceed the concentrations that are toxic for active animals, which confirm high resistance of resting eggs to the effect of heavy metals.*

Keywords: heavy metals, toxicity, resting eggs, hatching success, life cycle parameters.

Citation: Lopatina T.S., Bobrovskaya N.P., Oskina N.A., Zadereev E.S Comparative study of the toxic effect of cadmium and nickel on the active and resting stages of cladoceran *Moina macrocopa*. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2017, 10(3), 358-372. DOI: 10.17516/1997-1389-0031.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: egor@ibp.ru

Сравнительное исследование токсического воздействия никеля и кадмия на активные и покоящиеся стадии ветвистоусого рачка *Moina macroscopa*

**Т.С. Лопатина^а, Н.П. Бобровская^б,
Н.А. Оськина^{а,б}, Е.С. Задереев^{а,б}**

^аИнститут биофизики СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

^бСибирский федеральный университет

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Целью работы было сравнить концентрации солей тяжелых металлов кадмия и никеля, при которых наблюдаются негативные эффекты на выживаемость и параметры жизненного цикла активных и покоящихся стадий рачков вида *Moina macroscopa*. В острых и хронических тестах на активных животных определены стандартные для токсикологических исследований параметры: полуметальные (LC_{50}) концентрации, при которых наблюдается гибель 50 % тестируемых животных, и эффективные концентрации (EC_{50}), при которых происходит 50 % снижения чистой скорости воспроизводства у самок *Moina macroscopa*. LC_{50} для кадмия в 48-часовом тесте составила 0.18 мг/л; для никеля – 5.59 мг/л. EC_{50} для кадмия составила 0.005 мг/л, для никеля – 0.323 мг/л. Показано, что длительное (30-40 суток) хранение покоящихся яиц *M. macroscopa* в растворах кадмия и никеля в широком диапазоне концентраций (от фоновых до 60-70 г/л) не оказывает влияния ни на их выживаемость, ни на параметры жизненного цикла (удельная скорость ювенильного роста, количество образованных кладок, чистая скорость воспроизводства) животных, вылупившихся из этих яиц. Таким образом, покоящиеся яйца *M. macroscopa* способны без негативных последствий находиться в растворах токсикантов, существенно превышающих по концентрации токсичные уровни для активных рачков, что свидетельствует о их высокой устойчивости к действию тяжелых металлов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, токсичность, покоящиеся яйца, выживаемость, параметры жизненного цикла.

Введение

Ветвистоусые ракообразные – одни из наиболее распространенных организмов, используемых для тестирования токсичности различных соединений (Guilhermino et al., 2000). Уже в работах начала XX в. отмечалось, что ветвистоусые ракообразные крайне чувствительны к токсическим эффектам со-

лей тяжелых металлов (Surber, 1936). Сейчас в этой области исследований ежегодно публикуются сотни научных статей. Чаще всего биотесты с использованием представителей родов *Daphnia* или *Moina* ориентированы на оценку влияния токсикантов на физиологические (продолжительность жизни, плодовитость, скорость роста и др.) или поведенческие

(скорость фильтрации, скорость движения и др.) реакции организмов (Farre, Barcelo, 2003). Обычно по этим параметрам оценивается токсичность воды, содержащей растворенные химические соединения.

Одна из характерных особенностей ветвистоусых ракообразных – способность к диапаузе и формированию покоящихся яиц. При наступлении неблагоприятных условий самки меняют способ размножения с партеногенетического на гаметогенетический с последующим образованием эфиппийных яиц (Alekseev et al., 2007). Эфиппийные яйца ветвистоусых сохраняют жизнестойкость даже при воздействии достаточно суровых условий внешней среды (Radzikowski, 2013). Накапливаясь на дне водоемов, они формируют так называемые банки покоящихся яиц. Банки покоящихся яиц важны как для экологии, так и для эволюции вида: они служат источником восстановления популяции, способствуют распространению вида в пространстве и увеличивают генетическое разнообразие популяции (Hairston, 1996; Brendonck, De Meester, 2003).

Несмотря на очевидную важность стадии покоя в жизненном цикле ракообразных для динамики популяций и сообществ, оценки токсичности донных отложений и влияния токсикантов на покоящиеся стадии обитателей водных экосистем проводятся не так часто (например, Kerfoot et al., 1999; Alekseev et al., 2010). В подобных работах авторы оценивают влияние различных токсикантов на выживаемость покоящихся яиц и на эффективность их реактивации. Например, в работе Джианг и др. (Jiang et al., 2007) рассмотрено влияние тяжелых металлов (Cu, Pb, Cd) на покоящиеся яйца веслоногих ракообразных в донных отложениях и на выход животных из этих яиц. Алексеев и др. (Alekseev et al., 2010) исследовали влияние нескольких токсических сое-

динений (в том числе тяжелых металлов) на выживаемость покоящихся яиц нескольких видов планктонных ракообразных. В работах Райкова и др. (Raikow et al., 2007a, 2007b) по выживаемости покоящихся яиц водных беспозвоночных оценивали эффективность обработки балластных вод химикатами. В целом эти и другие немногочисленные работы показывают, что в стадии покоя ракообразные способны переносить более высокие концентрации токсичных веществ, чем в активной стадии. В то же время следует учесть, что донные отложения способны аккумулировать попадающие в водоем соединения, в том числе и токсичные. В результате концентрации токсикантов на дне водоема могут превышать таковые в водной толще и представлять определенную опасность для обитателей дна (например, Avila-Perez et al., 1999; Yang et al., 2009).

Другой важный вопрос – скажется ли токсическое воздействие во время стадии покоя на параметрах роста и размножения животных, вылупившихся из покоящихся яиц. Работ по исследованию параметров жизненного цикла животных, которые вышли из покоящихся яиц, подверженных токсическому воздействию, немного. Можно выделить исследование Навис и др. (Navis et al., 2013), в котором показано, что действие пестицида на покоящиеся яйца влияет не только на эффективность их реактивации, но и на выживаемость и размножение самок *Daphnia magna*, вылупившихся из этих яиц.

Учитывая несомненную важность покоящихся яиц планктонных ракообразных для экологии и эволюции планктонных сообществ, необходимость оценки влияния токсикантов на выживаемость покоящихся яиц и на последующее развитие вышедших из них животных не вызывает сомнений. Подобные исследования стоит начинать с соединений,

токсический эффект которых исследован достаточно детально для активных стадий рачков. К таковым можно отнести тяжелые металлы. Термин «тяжелые металлы» используется как общий термин для металлов, которые при определенных концентрациях токсичны для человека или других организмов (Tchounwou et al., 2012). Чаще всего в исследованиях с ветвистоусыми ракообразными в качестве модельных токсикантов используют медь, кадмий, никель, цинк, хром и другие металлы. Для нашего исследования мы выбрали тяжелые металлы, различающиеся своей токсичностью: кадмий и никель. Как показывают острые тесты с ветвистоусыми ракообразными, концентрации, при которых наблюдаются токсические эффекты кадмия, примерно на порядок ниже токсичных концентраций никеля (Wong, Wong, 1990; Wong et al., 1991).

Мы считаем, что исследования действия модельных токсикантов на покоящиеся яйца следует проводить комплексно. В первую очередь необходимо оценить острую и хроническую токсичность выбранных соединений для активных организмов. Острые и хронические тесты являются стандартными для токсикологических исследований и позволяют определить концентрации исследуемых веществ, при которых наблюдаются негативные эффекты на выживаемость или параметры жизненного цикла животных. Далее следует проверить устойчивость покоящихся яиц к действию этих веществ и по возможности определить концентрации токсикантов, которые вызывают гибель покоящихся яиц. И, наконец, проверить, сказывается ли токсическое воздействие на покоящиеся яйца на животных, вылупившихся из этих яиц. Проведение подобных экспериментов позволит сравнить критические концентрации выбранных со-

единений для активных и покоящихся стадий, что существенно расширит наше представление о их токсическом воздействии на природные сообщества. Нам не известны подобные комплексные количественные, а не качественные исследования действия модельных токсикантов на активные и покоящиеся стадии одного вида.

Таким образом, целью данной работы было определить и сравнить критические концентрации солей тяжелых металлов кадмия и никеля, при которых наблюдаются негативные эффекты на выживаемость или параметры жизненного цикла активных особей или покоящихся яиц и вылупившихся из них рачков вида *Moina macroscopa*.

Материалы и методы

Объект исследования

и методика проведения экспериментов

Модельным объектом исследования были ветвистоусые рачки *Moina macroscopa* и их покоящиеся яйца. Лабораторная культура *M. macroscopa* была получена из покоящихся яиц, предоставленных В.К. Чугуновым вместе с грунтом из временного пересыхающего пруда в окрестностях Института биологии внутренних вод РАН (п. Борок).

При проведении всех экспериментов животные находились в условиях с заданными температурой (26 °C) и фотопериодом (16 ч свет: 8 ч темнота). В качестве среды культивирования рачков использовали отстоянную (не менее 48 ч) водопроводную воду. В качестве корма использовали одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella vulgaris*, которую выращивали в накопительном режиме культивирования в колбах объемом 500 мл на среде Тамия. Перед использованием в качестве кормового субстрата водоросли концентрировали центрифугированием при скорости 3000 об/мин.

Условия содержания животных в экспериментах описаны далее.

В качестве модельных токсикантов использовали октогидрат сульфата кадмия ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) и хлорид гексагидрат никеля ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Концентрации кадмия и никеля в воде определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии на атомно-абсорбционном спектрометре Квант 2А в аналитической лаборатории Института биофизики СО РАН. Растворы тяжелых металлов для экспериментов готовили путем последовательного разбавления исходных стоковых растворов с высокой концентрацией соли.

Проведение острых тестов

на токсичность с активными рачками

Для проведения острых тестов использовали неполовозрелых самок, рожденных в благоприятных для партеногенеза условиях (одиночное культивирование в объеме среды 20 мл с ежесуточной сменой среды с концентрацией корма 200 000 кл/мл – условия, не лимитирующие рост и партеногенетическое размножение рачков (Задереев, Губанов, 1996)). Самок в первые сутки их жизни (размер 0.5-0.6 мм) рассаживали по одной в стаканчики с отстоянной водопроводной водой (20 мл) с добавкой токсиканта в определенной концентрации. В качестве действующих концентраций токсикантов на основе литературных данных (Wong, Wong, 1990; Wong et al., 1991) и собственных предварительных экспериментов были выбраны значения: 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 и 1.00 мг/л для кадмия и 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 9.0 и 18.0 мг/л для никеля. При проведении острых тестов животных не кормили. В качестве контроля использовали группу животных, находящихся в среде без токсиканта. Смертность животных определялась через 24 и 48 ч после начала эксперимента. Для каж-

дой концентрации токсиканта и в контроле было протестировано по 30 животных.

Проведение хронических тестов

на токсичность с активными рачками

После серии предварительных экспериментов для хронических тестов были выбраны следующие диапазоны концентраций: для кадмия – 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004 и 0.008 мг/л, для никеля – 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 и 0.8 мг/л. При проведении хронических тестов неполовозрелых самок (размер тела 0.5-0.6 мм), отрожденных в благоприятных для партеногенеза условиях, рассаживали по одной в стаканчики с отстоянной водопроводной водой (20 мл) с концентрацией корма в среде 200 000 кл/мл с добавкой определенной концентрации токсиканта. В качестве контроля использовали группу животных, культивируемых в среде без токсиканта. Среда заменялась на свежеприготовленную ежесуточно. Эксперимент вели до гибели всех животных. Ежесуточно фиксировали состояние животных и подсчитывали количество рожденных потомков. Для каждой концентрации токсиканта и в контроле было протестировано по 10 животных. Подробности оценки параметров жизненного цикла животных приведены ниже.

Исследование воздействия

тяжелых металлов

на выживаемость покоящихся яиц

Для получения покоящихся яиц небольшую группу животных (порядка 20 самок) поместили в стакан с объемом среды 4000 мл. Суспензию клеток *C.vulgaris* добавляли в среду один раз в сутки, в количестве необходимом для создания концентрации клеток 1 млн кл/мл. Замену среды на свежую производили один раз в трое суток. Такие условия культивирования обеспечивали быстрый рост

численности популяции, и массовое образование покоящихся яиц на 6-7 сутки развития популяции. Покоящиеся яйца ежедневно отбирали со дна стакана и хранили в темноте при температуре 4 °С.

В экспериментах использовали покоящиеся яйца, которые находились в состоянии покоя от 8 до 12 месяцев. Для каждого опыта отбирали неповрежденные эфиппиумы, содержащие по два оплодотворенных покоящихся яйца *M. macroscopa*. Для каждой концентрации токсиканта 60-70 покоящихся яиц помещали на 30-40 сут на дно микропробирки с притертой крышкой (объем пробирки 8 мл), в которую было добавлено 3 мл среды с определенной концентрацией токсиканта. Микропробирки с покоящимися яйцами в растворе токсиканта хранили в холодильнике в темноте при температуре 3 °С. Были использованы следующие концентрации токсикантов: для кадмия – 0.0015 (контроль), 0.7, 1.1, 6.3, 11.1, 18.6, 38.8, 66.3 г/л; для никеля – 0.0014 (контроль), 0.3, 0.7, 4.1, 8.8, 16.5, 39.5, 72.0 г/л. После 30-40 сут нахождения в среде с тяжелыми металлами яйца тщательно промывали дистиллированной водой и помещали в благоприятные для реактивации условия в термостат в отдельные стаканы с объемом среды 500 мл и концентрацией корма 400 тыс. кл/мл. Среда заменялась на свежеприготовленную каждые трое суток. С первого дня после помещения яиц в благоприятные для реактивации условия и далее каждые сутки отслеживалось появление вышедших из яиц животных. Пик вылупления яиц обычно наблюдался в первые 3-5 сут. Однако наблюдение за вылуплением проводилось на протяжении двух недель. После этого для каждой концентрации токсиканта рассчитывали эффективность реактивации яиц, как отношение количества вылупившихся яиц к общему количеству яиц.

Исследование жизненного цикла животных, вылупившихся из покоящихся яиц, подверженных действию тяжелых металлов

После начала вылупления яиц в эксперименте по исследованию воздействия тяжелых металлов на выживаемость покоящихся яиц свежестрожденных рачков (размерная группа 0.45-0.65 мм) отлавливали и рассаживали по одному для дальнейшего культивирования в стаканчики с объемом среды 20 мл и концентрацией корма 200 000 кл/мл. Для каждой концентрации токсиканта для каждого металла отбиралось по 15 самок. На протяжении эксперимента по оценке параметров жизненного цикла животных, вылупившихся из покоящихся яиц, подверженных действию тяжелых металлов, среда ежедневно заменялась на свежеприготовленную. Эксперименты вели до гибели всех животных.

Оценка параметров жизненного цикла животных

У каждой самки в экспериментах по исследованию параметров жизненного цикла (хронические тесты на токсичность с активными рачками и жизненный цикл рачков, вылупившихся из яиц, подверженных действию тяжелых металлов) определяли длину тела (L , мм) в первые сутки жизни (L_0) и за сутки до отрождения первого потомства (L_{fin}). Длину тела измеряли при 16-кратном увеличении от вершины головы до конца створок панциря. На основе линейных размеров рассчитывали удельную скорость ювенильного роста (g):

$$g = \frac{(\ln L_{fin} - \ln L_0)}{t}, \quad (1)$$

где t – интервал времени между днями измерения линейных размеров тела (сут).

Для каждой самки фиксировали время появления первой и последующих кладок,

подсчитывали количество потомков в каждой кладке и количество образованных кладок на протяжении жизни животного, фиксировали сутки смерти самки. Далее на основании этих данных для каждой концентрации токсиканта рассчитывали среднюю продолжительность жизни и среднее количество образованных кладок у группы протестированных животных. Также на основании данных по плодовитости и продолжительности жизни рассчитывали чистую скорость воспроизводства (R_0) (Krebs, 1985):

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x \cdot m_x, \quad (2)$$

где l_x – доля животных, доживших до возраста x (сут), m_x – средняя плодовитость самок в возрасте x (потомков/самку).

Статистические методы

Влияние концентрации металлов на эффективность реактивации покоящихся яиц и чистую скорость воспроизводства оценивали с помощью стандартного корреляционного анализа между двумя переменными (концентрация токсиканта и зависимый параметр); на удельную скорость ювенильного роста, среднюю продолжительность жизни и количество образованных кладок – однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, univariate tests of significance). Все статистические расчеты делали в программе STATISTICA 8.0. Значения LC_{50} в острых тестах на токсичность определяли с помощью пробит-анализа.

Результаты

Острый и хронический тесты на токсичность с активными рачками

В остром тесте на токсичность выживаемость рачков снижалась с увеличением

концентрации тяжелых металлов в среде. Практически для всех протестированных концентраций (за исключением контрольной) доля выживших животных в 48-часовом тесте была меньше, чем в 24-часовом тесте (рис. 1). В острых тестах с животными были определены стандартные в токсикологических экспериментах параметры – полулетальные концентрации (LC_{50}) для кадмия и никеля (табл. 1).

При проведении хронических тестов на токсичность зафиксировано достоверное уменьшение значений всех исследуемых параметров жизненного цикла рачков (за исключением удельной скорости ювенильного роста при воздействии кадмия) с ростом концентрации токсикантов (см. уровни значимости воздействия токсикантов на параметры жизненного цикла в табл. 2).

При этом из всех протестированных параметров жизненного цикла наиболее чувствительными к действию токсикантов (наибольшее снижение значения параметра при максимальной концентрации токсиканта по сравнению со значением параметра в контрольной среде) были репродуктивные параметры: количество образованных кладок и чистая скорость воспроизводства самок. Эффективная концентрация токсиканта, при которой происходит снижение чистой скорости воспроизводства в два раза (EC_{50}), у самок *M. macroscopa* составила: для кадмия – 0.005 мг/л, для никеля – 0.250 мг/л.

Хроническое воздействие токсикантов на покоящиеся яйца и рачков, вылупившихся из этих яиц

Хроническое воздействие кадмия и никеля на покоящиеся яйца *M. macroscopa* не оказало достоверного влияния на эффективность реактивации покоящихся яиц (рис. 2)

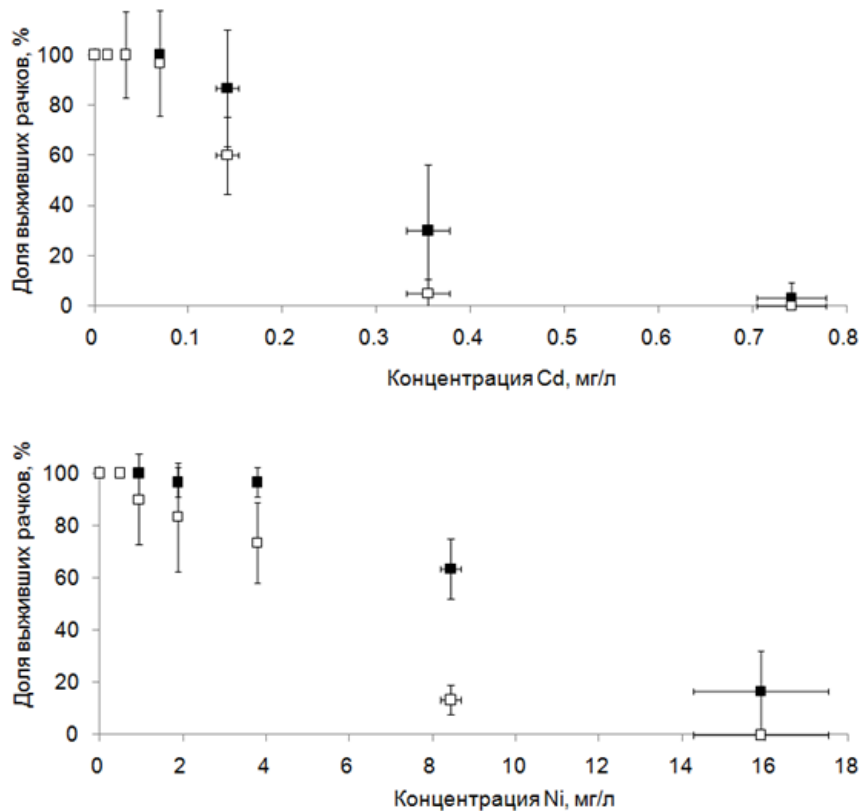


Рис. 1. Влияние кадмия (Cd) и никеля (Ni) на выживаемость рачков *M. macroscopa* в остром тесте на токсичность через 24 часа (черные маркеры) и 48 часов (белые маркеры) воздействия токсиканта

Таблица 1. Полулетальные концентрации (LC_{50} , мг/л) солей кадмия (Cd) и никеля (Ni) для самок *Moina macroscopa* в острых тестах на токсичность

Токсикант	LC_{50} (24 часа)	LC_{50} (48 часов)	Источник
Cd	0.256	0.200	Наши данные
	-	0.0532	Xu et al., 2011
	0.218	0.013	Pokethitiyook et al., 1987
	0.418	-	Garcia et al., 2004
Ni	10.86	3.86	Наши данные
	-	7.00	Wong et al., 1991
	2.20	0.46	Pokethitiyook et al., 1987
	-	6.84	Tabche et al., 2000
	23.59	6.48	Wong, 1993

Таблица 2. Параметры жизненного цикла рачков *Moina macroscopa* в хронических тестах на токсичность растворов кадмия и никеля.

Концентрация токсиканта, мг/л	Средняя продолжительность жизни, суток	Удельная скорость ювенильного роста, 1/сутки	Количество образованных кладок, штук	Чистая скорость воспроизводства, потомков/самку
Кадмий				
0.0004 (контроль)	13.0 ± 2.4	0.20 ± 0.05	5.4 ± 1.3	53.4
0.0005	11.3 ± 3.6	0.25 ± 0.04	5.1 ± 2.1	54.4
0.001	13.4 ± 3.4	0.25 ± 0.06	5.6 ± 2.1	58.9
0.002	12.5 ± 2.8	0.23 ± 0.06	3.9 ± 1.7	33.2
0.004	10.0 ± 3.4	0.25 ± 0.03	2.5 ± 1.1	21.4
0.008	7.9 ± 1.8	0.25 ± 0.05	1.8 ± 0.9	17.8
Достоверность эффекта	F(5, 54)=5.05 p<0.001 (ANOVA)	F(5, 54)=1.64 p=0.16 (ANOVA)	F(5, 54)=9.98 p<0.001 (ANOVA)	r = -0.87 p=0.02 (корреляционный анализ)
Никель				
0.0004 (контроль)	14.6 ± 2.6	0.28 ± 0.03	7.3 ± 1.4	58.4
0.02	11.4 ± 2.9	0.27 ± 0.02	5.3 ± 2.1	43.9
0.033	12.0 ± 2.7	0.26 ± 0.04	5.7 ± 1.9	43.3
0.08	10.2 ± 2.4	0.25 ± 0.02	4.5 ± 1.8	31.9
0.16	12.0 ± 1.4	0.26 ± 0.04	5.4 ± 0.9	41.3
0.32	7.9 ± 2.6	0.24 ± 0.07	2.8 ± 1.0	19.8
0.64	4.8 ± 0.9	0.16 ± 0.05	0.6 ± 0.7	2.7
Достоверность эффекта	F(6, 62)=18.76 p<0.001 (ANOVA)	F(6, 62)=8.75 p<0.001 (ANOVA)	F(6, 62)=20.82 p<0.001 (ANOVA)	r = -0.93 p=0.002 (корреляционный анализ)

(корреляционный анализ: Cd – $r = -0.44$, $p = 0.12$; Ni – $r = 0.15$, $p = 0.63$). Таким образом, покоящиеся яйца *M. macroscopa* оказались не чувствительными к широкому диапазону действующих концентраций тяжелых металлов кадмия и никеля. Для всех исследованных параметров жизненного цикла животных, вылупившихся из яиц, которые провели часть периода покоя в растворе тяжелых металлов, не зафиксировано достоверного эффекта концентрации токсиканта на значение параметра (см. уровни значимости воздействия токсикантов на параметры жизненного цикла в табл. 3).

Обсуждение

Острые и хронические тесты на активных рачках

Полученные в острых тестах на токсичность значения полулетальных концентраций кадмия и никеля и ранжирование этих металлов по их токсичности (Cd более токсичен, чем Ni) в целом соответствуют литературным данным (табл. 1). Вариации значений полулетальных концентраций металлов, полученных в разных экспериментах, по всей видимости, объясняются зависимостью токсичности металла от условий эксперимента.

В недавно опубликованной обзорной работе

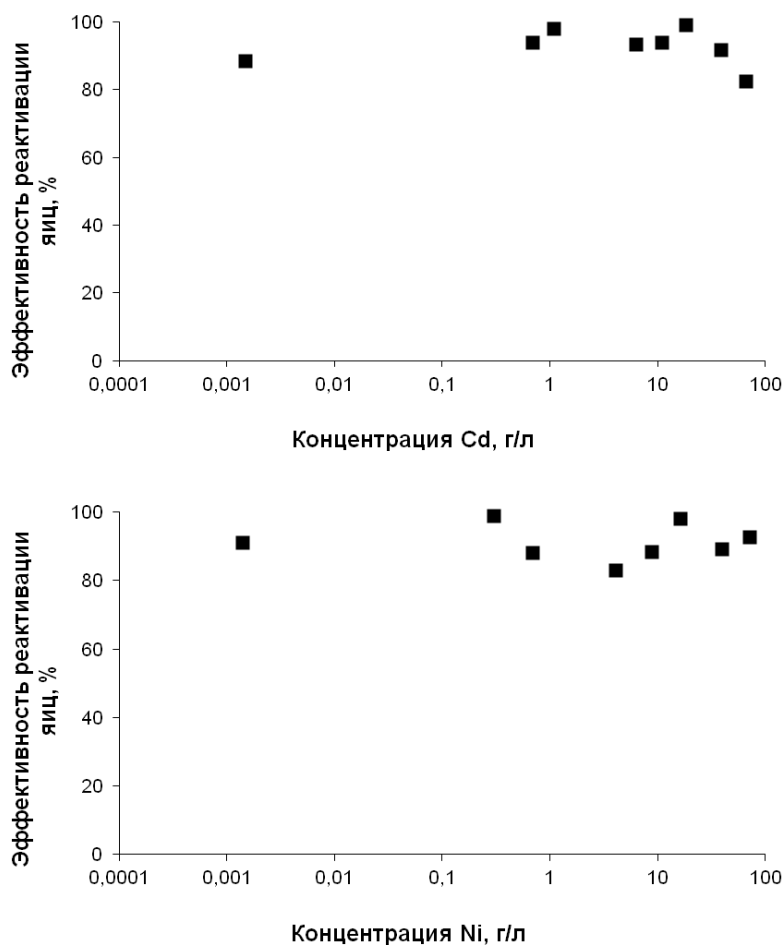


Рис. 2. Эффективность реактивации покоящихся яиц *M. macroscopa* после инкубации в течение 30 суток в растворах кадмия (Cd) и никеля (Ni) различной концентрации. Ось X – логарифмическая

(Magalhaes et al., 2015) отмечается, что понимание механизмов токсичности металлов в водных экосистемах – сложная задача из-за влияния многих химических и биологических факторов. В частности, на токсичность металлов влияют ионный состав и pH среды, концентрация корма в среде, физиологическое состояние используемых организмов.

Полученные в хронических тестах на токсичность концентрации токсикантов, вызывающие негативные эффекты в жизненном цикле рачка, были также близки к литературным данным. Так, в работе Вонг и Вонг (Wong, Wong, 1993) показано, что негативные эффек-

ты кадмия для *M. macroscopa* не проявляются при его концентрации в среде 0.001 мг/л и ниже и существенно снижают репродуктивные параметры животных при концентрации 0.005 мг/л. При исследовании хронической токсичности никеля для самок *M. macroscopa* показано, что негативные эффекты никеля выражены при его концентрации 0.50 мг/л (Wong, 1993).

Действие тяжелых металлов на покоящиеся яйца

В наших экспериментах зафиксирована устойчивость покоящихся яиц к более высо-

Таблица 3. Параметры жизненного цикла рачков *Moina macroscopa*, вылупившихся из покоящихся яиц после 30-ти дневной экспозиции яиц в растворах тяжелых металлов кадмия и никеля

Концентрация токсиканта, г/л	Средняя продолжительность жизни, суток	Удельная скорость ювенильного роста, 1/сутки	Количество образованных кладок, штук	Чистая скорость воспроизводства, потомков/самку
Кадмий				
0.0015 (контроль)	10.5 ± 2.7	0.39 ± 0.02	4.4 ± 1.8	46.7
0.7	9.9 ± 2.7	0.36 ± 0.047	3.9 ± 1.9	43.5
1.1	9.4 ± 2.9	0.39 ± 0.04	3.7 ± 1.8	36.1
6.3	11.2 ± 2.6	0.39 ± 0.05	4.4 ± 1.6	50.5
11.1	11.9 ± 3.1	0.37 ± 0.03	4.7 ± 1.9	51.1
18.6	10.7 ± 2.8	0.39 ± 0.02	3.9 ± 1.7	46.1
38.8	9.9 ± 2.9	0.38 ± 0.04	3.7 ± 2.2	36.6
66.3	9.8 ± 2.5	0.36 ± 0.05	3.8 ± 1.9	39.8
Достоверность эффекта	F(7, 139)=1.68 p=0.12 (ANOVA)	F(7, 139)=1.73 p=0.11 (ANOVA)	F(7, 139)=0.91 p=0.50 (ANOVA)	r=-0.37 p=0.37 (корреляционный анализ)
Никель				
0.0014 (контроль)	9.9 ± 3.3	0.35 ± 0.03	4.5 ± 2.3	51.9
0.3	11.4 ± 3.5	0.33 ± 0.04	4.8 ± 2.3	56.8
0.7	11.0 ± 3.6	0.34 ± 0.03	4.8 ± 1.9	54.4
4.1	11.8 ± 2.2	0.35 ± 0.04	5.3 ± 1.3	68.2
8.8	10.9 ± 3.3	0.35 ± 0.04	4.6 ± 1.7	61.8
16.5	10.1 ± 3.4	0.36 ± 0.05	4.2 ± 1.9	50.9
39.5	9.2 ± 3.7	0.36 ± 0.05	3.8 ± 2.1	42.0
72.0	10.7 ± 4.1	0.35 ± 0.03	4.3 ± 2.3	51.9
Достоверность эффекта	F(7, 150)=1.22 p=0.61 (ANOVA)	F(7, 150)=1.53 p=0.29 (ANOVA)	F(7, 150)=1.01 p=0.41 (ANOVA)	r=-0.47 p=0.24 (корреляционный анализ)

ким концентрациям тяжелых металлов (до 60-70 г/л), чем были получены ранее. Так, при оценке действия нескольких металлов и органических загрязнителей на покоящиеся стадии нескольких видов зоопланктона показано (Alekseev et al., 2010), что яйца *Moina macroscopa* способны до 100 дней находиться в растворе с концентрацией меди 500 мг/л без потери выживаемости. Эксперименты с покоящимися яйцами *Acartia pacifica* показали (Jiang et al., 2007), что на выживаемость яиц влияет как длитель-

ность контакта с тяжелыми металлами, так и их концентрация. В этих экспериментах критические концентрации меди и кадмия, которые существенно снижают эффективность реактивации покоящихся яиц, составили 742 мг/кг и 6.8 мг/кг соответственно. При исследовании действия сублетальных концентраций цинка на покоящиеся яйца рачка *Artemia parthenogenetica* (Sarabia et al., 2008) было показано, что концентрации цинка до 5 мг/л не влияют на выживаемость покоящихся яиц.

В предварительных экспериментах мы показали, что если покоящиеся яйца, находящиеся в воде с высоким содержанием тяжелых металлов, не отмыть перед реактивацией яиц, будет наблюдаться высокая смертность молоди, вылупившейся из яиц. В том случае если яйца отмыты – смертности не наблюдается и показатели роста и размножения вылупившихся рачков не отличаются от контрольной группы. Можно предположить, что смертность животных связана с диффузией в воду тяжелых металлов, непрочно связавшихся с поверхностью покоящихся яиц. Как показывают острые и хронические эксперименты, ювенильные рачки ветвистоусых крайне чувствительны к действию тяжелых металлов. Даже небольшие концентрации способны вызвать смертность или изменение репродуктивных параметров. В своей работе мы исключили эффект загрязнения воды токсикантами во время реактивации яиц путем тщательной отмывки их после воздействия токсиканта. В большинстве процитированных выше работ при описании методики не отмечено, отмывали ли покоящиеся стадии после воздействия токсикантов. Возможно, полученные нами высокие значения устойчивости покоящихся яиц по сравнению с многими опубликованными данными связаны, в том числе, и с различиями методик. По словам одного из крупнейших в мире специалистов по исследованию покоящихся стадий ракообразных Люка Брендонка (Brendonck, pers. communication), стандартизация методик является одной из ключевых проблем в этой области исследований.

Так как количество исследований по оценке действия токсикантов на покоящиеся яйца ракообразных не велико, имеет смысл сравнить данные по оценке чувствительности покоящихся яиц к разным токсикантам.

Так, в работе (Most et al., 2015) оценивали действие десяти органических загрязнителей на выживаемость покоящихся яиц *Daphnia longispina*. После 15-дневного воздействия зафиксирован стимулирующий эффект токсикантов на вылупляемость покоящихся яиц. При этом вышедшее из яиц потомство демонстрировало повышенную смертность и аномалии в развитии, связанные с наличием токсикантов в воде. Подобные результаты трудно интерпретировать. Малое время воздействия, присутствие токсикантов не только во время периода покоя, но и в момент реактивации яиц – представляется, что такая методика не дает ответа на вопрос о чувствительности покоящихся яиц в период покоя к действию токсикантов.

При исследовании параметров жизненного цикла животных, которые вышли из покоящихся яиц, подверженных токсическому воздействию, выявлено, что пестициды карбарил и феноксикарб (carbaryl и fenoxycarb) влияют как на эффективность реактивации покоящихся яиц *Daphnia magna*, так и на выживаемость и параметры жизненного цикла вылупившихся из этих яиц животных (Navis et al., 2013). Позже (Navis et al., 2015) при исследовании чувствительности покоящихся яиц *D. magna* на разной стадии эмбрионального развития к феноксикарбу авторы показали, что оболочка эфиппиума не оказывает значимой защиты от пестицида: концентрации пестицида в тканях эмбриона в покоящемся яйце не отличались от таковых для эмбриона, лишённого защитной оболочки. В результате летальная концентрация феноксикарба для покоящихся яиц лишь в два раза превышала таковую для активных дафний.

В целом следует отметить, что чувствительность покоящихся яиц к разным токсикантам существенно различается. Оценивая токсичность тяжелых металлов, органиче-

ских веществ и низкомолекулярных соединений, Алексеев с соавторами предположили (Alekseev et al., 2010), что низкомолекулярные соединения при прочих равных условиях более токсичны для покоящихся яиц. Возможно, для оценки токсичности различных соединений для покоящихся яиц в дальнейшем потребуются детальные исследования структуры защитной оболочки эфиппиума и моделирование процессов взаимодействия токсикантов с этими защитными структурами.

В нашем исследовании с использованием рачка *Moina macroscopa* мы сравнили чувствительность различных тестов (острое и хроническое воздействия на активных рачков, хроническое воздействие на покоящиеся яйца) к действию двух тяжелых металлов. Видно, что наибольшая чувствительность к действию токсикантов наблюдается на уровне репродуктивных параметров в хроническом тесте с активными рачками. В этом тесте зафиксированы наименьшие концентрации токсикантов, приводящие к негативным изменениям в жизненном цикле. По всей видимости, при оценках негативного воздействия тяжелых металлов на водные экосистемы и определении критических концентраций токсикантов необходимо использовать именно эти параметры.

К схожему выводу пришли авторы уже процитированной выше работы по оценке действия цинка на покоящиеся яйца артемии (Sarabia et al., 2008). Авторы предположили, что более важной для зоопланктона будет хроническая токсичность растворенных в воде тяжелых металлов на животных в активной стадии, а не эффекты токсичных донных осадков на покоящиеся яйца. С другой стороны, для яиц *Daphnia*, извлеченных из природного зерна после многолетнего контакта с токсичными металлами, показано досто-

верное влияние концентрации токсиканта в донных осадках на эффективность реактивации покоящихся яиц (Rogalski, 2015). Вполне возможно, для влияния тяжелых металлов на реактивацию яиц требуется более длительное нахождение яиц в растворе токсиканта. Это предположение требует проверки в экспериментах с длительным нахождением яиц в воде или грунте с высокими концентрациями металлов.

Заключение

В острых тестах с рачками *Moina macroscopa* определены полулетальные концентрации (LC_{50}) для тяжелых металлов (кадмия и никеля). Значения LC_{50} для кадмия в 24-часовом и 48-часовом тестах составили 0.28 и 0.18 мг/л; для никеля – 10.57 и 5.59 мг/л соответственно. Показано, что наиболее чувствительными параметрами жизненного цикла рачков при хроническом воздействии тяжелых металлов являются репродуктивные параметры животных. Эффективная концентрация (EC_{50}), при которой происходит 50 % снижения чистой скорости воспроизводства у самок *Moina macroscopa* для кадмия составляет 0.005 мг/л, для никеля – 0.323 мг/л.

Показано, что покоящиеся яйца ветвистоусого рачка *Moina macroscopa* обладают высокой устойчивостью к действию тяжелых металлов. Длительное хранение (30-40 сут) покоящихся яиц *M. macroscopa* в растворах тяжелых металлов кадмия и никеля в широком диапазоне концентраций (от фоновых до 60-70 г/л) не оказывало влияния на их выживаемость и на параметры жизненного цикла животных (удельная скорость ювенильного роста, количество образованных кладок, чистая скорость воспроизводства), вылупившихся из подверженных воздействию токсикантов покоящихся яиц.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-05199, при частичном финансировании Совета по грантам Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ (грант НШ-9249.2016.5). Авторы работы благодарны двум анонимным рецензентам, чьи замечания существенно улучшили текст статьи.

Список литературы

Заdereев Е.С., Губанов В.Г. (1996) Роль плотности популяции в индукции гамогенеза у *Moina macroscopa* (Crustacea:Cladocera). *Журнал Общей Биологии*, 57 (3): 360-367 [Zadereev E.S., Gubanov V.G. (1996) The role of population density in gametogenesis induction in *Moina macroscopa* (Crustacea:Cladocera). *Journal of General Biology* [Zhurnal Obshechi Biologii], 57 (3): 360-367 (in Russian)]

Alekseev V., Makrushin A., Hwang J.S. (2010) Does the survivorship of activated resting stages in toxic environments provide cues for ballast water treatment? *Marine Pollution Bulletin*, 61: 254-258

Alekseev V.R., de Stasio B.T., Gilbert J.J. (Eds.) (2007) *Diapause in aquatic invertebrates: theory and human use*. Netherlands, Springer, 257 p.

Avila-Perez P., Balcazar M., Zarazua-Ortega G., Barcelo-Quintal I., Diaz-Delgado C. (1999) Heavy metal concentrations in water and bottom sediments of a Mexican reservoir. *Science of the Total Environment*, 234: 185-196

Brendonck L., De Meester L. (2003) Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491: 65–84

Farre M., Barcelo D. (2003) Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 299-310

Garcia G.G., Nandini S., Sarma S.S.S. (2004) Effect of cadmium on the population dynamics of *Moina macroscopa* and *Macrothrix triserialis* (Cladocera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 717–724

Guilhermino L., Diamantino T., Silva M.C., Soares A.M. (2000) Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46 (3): 357-362

Hairton N.G. (1996) Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1087-1092

Jiang X.D., Wang G.Z., Li S.J., He J.F. (2007) Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 733-737

Kerfoot W.C., Robbins J.A., Weider L.J. (1999) A new approach to historical reconstruction: Combining descriptive and experimental paleolimnology. *Limnology and Oceanography*, 44 (5): 1232-1247

Krebs C.J. (1985) *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance*. New York, Harper & Row, 800 p.

Magalhaes D.D., Marques M.R.D., Baptista D.F., Buss D.F. (2015) Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environmental Chemistry Letters*, 13: 69-87

Most M., Chiaia-Hernandez A.C., Frey M.P., Hollender J., Spaak P. (2015) A mixture of environmental organic contaminants in lake sediments affects hatching from *Daphnia* resting eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34: 338–345

Navis S., Waterkeyn A., Putman A., De Meester L., Vanermen G., Brendonck L. (2015) Timing matters: sensitivity of *Daphnia magna* dormant eggs to fenoxycarb exposure depends on embryonic developmental stage. *Aquatic Toxicology*, 159: 176–183

Navis S., Waterkeyn A., Voet T., De Meester L., Brendonck L. (2013) Pesticide exposure impacts not only hatching of dormant eggs, but also hatchling survival and performance in the water flea *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22: 803–814

Pokethitiyook P., Upatham E.S., Leelhaphunt O. (1987) Acute toxicity of various metals to *Moina macrocopa*. *Natural History Bulletin of the Saim Society*, 35: 47–56

Radzikowski J. (2013) Resistance of dormant stages of planktonic invertebrates to adverse environmental conditions. *J. Plankton Res.*, 35: 707–723

Raikow D.F., Landrum P.F., Reid D.F. (2007a) Aquatic invertebrate resting egg sensitivity to glutaraldehyde and sodium hypochlorite. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 1770–1773

Raikow D.F., Reid D.F., Blatchley E.R., Jacobs G., Landrum P.F. (2007b) Effects of proposed physical ballast tank treatments on aquatic invertebrate resting eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26: 717–725

Rogalski M.A. (2015) Tainted resurrection: metal pollution is linked with reduced hatching and high juvenile mortality in *Daphnia* egg banks. *Ecology*, 96: 1166–1173

Sarabia R., Del Ramo J., Varó I., Díaz-Mayans J., Torreblanca A. (2008) Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia parthenogenetica*. *Science of the Total Environment*, 398: 48–52

Surber E.W. (1936) The culture of *Daphnia*. *The Progressive Fish-Culturist*, 3: 1–6

Tabche L.M., Oliván L.G., Martínez M.G., Castillo C.R., Santiago A.M. (2000) Toxicity of nickel in artificial sediment on acetylcholinesterase activity and hemoglobin concentration of the aquatic flea, *Moina macrocopa*. *Journal of Environmental Hydrology*, 8: 1–10

Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012) Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia Supplementum. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 101: 133–164

Wong C.K. (1993) Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the cladoceran *Moina macrocopa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 633–639

Wong C.K., Wong P.K. (1990) Life table evaluation of the effects of cadmium exposure on the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 135–141

Wong C.K., Wong P.K., Tao H. (1991) Toxicity of nickel and nickel electroplating water to the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 448–454

Xu U.S., Wang D., Ye J., Jia C. (2011) Joint toxicity effect of four heavy metal ions on *Moina macrocopa*. *Journal of Biology*, 3

Yang Z., Wang Y., Shen Z., Niu J., Tang Z. (2009) Distribution and speciation of heavy metals in sediments from the mainstream, tributaries, and lakes of the Yangtze River catchment of Wuhan, China. *Journal of Hazardous Materials*, 166: 1186–1194